

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

9

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01285195 A**

(43) Date of publication of application: **16.11.89**

(51) Int. Cl

C12P 19/12

(21) Application number: **63114777**

(22) Date of filing: **13.05.88**

(71) Applicant: **NATL FOOD RES INST NIPPON
DENPUN KOGYO KK**

(72) Inventor: **KOBAYASHI SHOICHI
SEKI KOUJI
KISHIMOTO MAMORU
KADOMA MITSURU
TAKANO TOSHIYA
NAGATA KAZUSHI
HONBO KEIKICHI**

(54) PRODUCTION OF DIFRUCTOSE-CYANHYDRIDE

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain difructose-cyanhydride by immobilizing inulin fructotransferase on a silica-based carrier using chitosan as an immobilizing material, and acting the resulting immobilized carrier on inulin.

CONSTITUTION: Inulin fructotransferase is immobilized on a silica-based carrier using chitosan as an immobilizing material. The inulin fructotransferase on

the immobilized carrier is acted on inulin and/or inulin-contg. vegetable liquid extract to produce the objective difructose-cyanhydride (DFA). The raw material for inulin is e.g. a liquid extract from inulin-contg. vegetables such as girasole, dahlia and burdock, which is partially purified by filtration and decoloring and then directly passed through a column packed with the immobilized DFAI synthetic enzyme and/or immobilized DFAII synthetic enzyme.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

9

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-285195

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)11月16日

C 12 P 19/12

8214-4B

審査請求 有 請求項の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 ジフルクトース・ジアンヒドリドの製造方法

⑮ 特 願 昭63-114777

⑯ 出 願 昭63(1988)5月13日

⑰ 発明者	小林 昭一	茨城県土浦市乙戸南2丁目9番2号
⑰ 発明者	積 浩二	鹿児島県鹿児島市和田町924番地6
⑰ 発明者	岸 本 守	鹿児島県鹿児島市中山町3129番地53 日葦中山社宅西の2
⑰ 発明者	門 間 充	茨城県つくば市吾妻2丁目1506番地809-307
⑰ 発明者	高 野 敏弥	茨城県つくば市竹園3丁目643番地111-202
⑰ 発明者	永 田 一志	鹿児島県鹿児島市中山町3129番地53 日葦中山社宅西の1
⑰ 発明者	本 坊 慶吉	鹿児島県鹿児島市薬師1丁目7番33号
⑰ 出 願 人	農林水産省食品総合研究所長	茨城県つくば市観音台2丁目1-2
⑰ 出 願 人	日本澱粉工業株式会社	鹿児島県鹿児島市南栄3丁目20番地
⑰ 代 理 人	弁理士 久保田 藤郎	

明 細 書

1. 発明の名称
ジフルクトース・ジアンヒドリドの製造方法。
2. 特許請求の範囲
1) 固定化素材としてキトサン、シリカ系担体を用い固定化したイヌリンフラクトトランスフェラーゼをイヌリン及び／またはイヌリン含有植物抽出液に作用させることを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドの製造方法。
2) 固定化架橋剤としてグルタルアルデヒド、ゲニピンを用いる請求項1記載の製造方法。
3. 発明の詳細な説明
(産業上の利用分野)
本発明は、イヌリン及び／またはイヌリン含有植物抽出液より固定化酵素を利用してジフルクトース・ジアンヒドリドを連続的に効率よく、かつ高収率で製造する方法に関するものである。尚、ここでいうジフルクトース・ジアンヒドリドとは

ジフルクトース・ジアンヒドリド I (以下、DFAI という) 及びジフルクトース・ジアンヒドリド III (以下、DFAIII という) を含む。

DFAI はフラクトース 2 分子が 1, 2' 及び 2, 1' の 2 箇所で結合している非還元性の 2 糖類、DFAIII は 1, 2'; 2, 3' で結合している 2 糖類である。これらは水に易容で、蔗糖の約半分の甘味を有しているが、これは低甘味を要求する最近の市場動向を満足するものである。また分子構造に起因した性質として、非還元性で人体へは消化、吸収されにくく低カロリーであること、かつ熱に対して安定で分解されにくい糖である。それとともに本発明者らは、DFAI 及び DFAIII にう蝕予防効果、腸内ビフィズス菌増殖効果があることを見い出した。

(従来の技術)

先に、本発明者らは、イヌリン及び／またはイヌリン含有植物抽出液にアースロバクター・グロビフォルミスに属する細菌及び／またはその生産する酵素、イヌリンフラクトトランスフェラーゼ

特開平1-285195(2)

を利用してDFAI及び／またはDFAⅢを製造する方法を確立した。(特願昭61-119087、同61-119088)

〔発明が解決しようとする課題〕

しかし、インスリン及び／またはインスリン含有植物抽出液に固體、もしくはその産生する酵素を作用させる回分式の製造方法では、酵素の安定性などの制約により反応時のpH、温度等の範囲が限定され、また反応終了後酵素を回収し再利用することが困難であることなど工業的にみて非常に不経済である。また反応終了後の精製工程に時間的損失を生じるという問題がある。

〔課題を解決する為の手段〕

そこで本発明者は、インスリンフラクトトランスフェラーゼ、DFAI合成タイプ(以下、DFAI合成酵素という)及び／またはインスリンフラクトトランスフェラーゼ、DFAⅢ合成タイプ(以下、DFAⅢ合成酵素という)のおのおのをキトサンビーズ、またはアルキル化CPGを用いて固定化した後、カラムに充填し一定流量でインスリン溶

液及び／またはインスリン含有植物抽出液を通液することで連続的にかつ高収率でDFAI及び／またはDFAⅢを生産することを見い出した。

本発明を以下に示す。

1) 固定化素材としてキトサン、シリカ系担体を用い固定化したインスリンフラクトトランスフェラーゼをインスリン及び／またはインスリン含有植物抽出液に作用させることを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドの製造方法。

2) 架橋剤としてグルタルアルデヒド、ゲニピンを用いて固定化したインスリンフラクトトランスフェラーゼを用いるジフルクトース・ジアンヒドリドの製造方法。

キトサンは、グルコサミンがβ-1, 4結合しているセルロース類似の分子構造を持った多糖類で、その分子内にアミノ基を有している為、グルタルアルデヒド等の架橋剤を用いて容易に酵素などの蛋白質を固定化することが可能である。最近、キトサンをビーズ状に成形した製品や、キトサンに種々の架橋処理を行い物理的強度や耐酸性を高

めたビーズ状の製品が市販されている。

アルキル化CPGは、CPG(コントロールドポアガラス エレクトロヌクレオニクス社製)をγ-アミノプロピルトリエソキシシランでシラン化したものである。

これら担体をグルタルアルデヒド及び／またはゲニピン(クテナシ由来の天然架橋剤 サントリ-社製)を用いて酵素との架橋を行った。

以下に固定化方法を述べる。

尚、固定化方法は以下にのべることに限ったものではなく、担体としてはアミノ基を持つものであれば、本発明の方法に利用できる。

固定化担体としてキトサンビーズ(キトパールBCW3507、富士紡績社製、スベサーとして芳香族ジイソシアナート架橋処理がなされている粒径7 μ mの製品)を用いた場合は以下のように固定化する。DFAI合成酵素を産生する菌株、アースロバクター・グロビフォルミス、S14-3及び／またはDFAⅢ合成酵素を産生する菌株、アースロバクター・グロビフォルミス、C11-

1を30℃で14~16時間培養し、遠心分離等の除菌処理して得られた培養上清を緩安塩析により濃縮して固定化用粗酵素液とした。キトビーズに2.5%(W/V)グルタルアルデヒドを加え、室温で1時間架橋反応を行った後、未反応のグルタルアルデヒドを洗浄除去し、粗酵素液を加え、室温で2時間、酵素と担体との結合反応を行った。その後、未反応の酵素を洗い流し固定化DFAI合成酵素及び／または固定化DFAⅢ合成酵素が得られた。固定化酵素量は架橋反応条件により異なるが、通常210国際単位であるベッドボリュームは3.5mg担体である。得られたキトサンビーズ固定化DFAI合成酵素及び／またはキトサンビーズ固定化DFAⅢ合成酵素をカラムに充填し、極低速から1時間当たり固定化酵素量の20倍流量の範囲でインスリン及び／またはインスリン含有植物抽出液を通液すると、インスリンはほぼ完全に分解され、反応液としてオリゴ糖や単糖類を含んだDFAIおよび／またはDFAⅢ溶液が連続的に得られた。通液は昇流、あるいは降流のいずれ

特開平1-285195 (3)

れでもよい。

また、10% (W/V) のイヌリン溶液を1ヶ月間固定化DFAI合成酵素及び/または固定化DFAIII合成酵素を充填したカラムに昇流式で1時間当たり固定化酵素量の5倍の流速で通液した結果、いずれの固定化酵素も活性の低下は殆んど見られず、充分実用に耐え得ることが判明した。

CPGの場合も、10% (W/V) アーアミノプロビルトリエソキシシランでシラン化しアミノ基を導入した後、上述と同様の操作を行い固定化酵素が得られ、カラムに充填しイヌリン溶液を通液することができる。

ゲニピンを架橋剤として用いる場合は、ゲニピンを1% (W/V) とし、担体とDFAI及び/またはDFAIII合成酵素との架橋反応は40℃で一晩行った。

この他の共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、架橋法、包括法など各種の固定化法による固定化DFA合成酵素でも本発明の方法を適用できる。

訪談社製) にゲニピンを架橋剤として固定化したDFAI合成酵素充填カラムに昇流式でSV4 (1時間当たりカラム体積の4倍の流量) で、かつ50℃の温度をかけて反応を行った。

反応液をカラムに充填したイオン交換樹脂で連続的に脱塩後、処理液中の糖組成を高速度液体クロマトグラフィーで分析したところ、DFAI: 87.9%、フラクトオリゴ糖: 11.1%、その他: 1.0%であった。

実施例2

市販イヌリンを原料として用い、pH5でキトサンビーズにグルタルアルデヒドを架橋剤として固定化したDFAIII合成酵素充填カラムに昇流式でSV6の流速で、かつ60℃の温度をかけて連続的に反応を行った。

反応液を実施例1と同様にして分析したところDFAIII: 88.2%、フラクトオリゴ糖: 10.8%、その他: 1.0%であった。

実施例3

市販イヌリンを原料として用い、pH5.5でアルキル化CPGにグルタルアルデヒドを架橋剤と

イヌリン原料としては、キクイモ、ダリア、チコリー、ゴボウなどのイヌリン含有植物の抽出液が考えられるが、濾過、脱色等の部分精製したものや直接、固定化DFAI合成酵素及び/または固定化DFAIII合成酵素を充填したカラムに通液することができる。この他にも微生物起源のフラクトースポリマー、例えばバチルス・ヴルガタスのレバンなども原料として考えられる。

植物からのイヌリン抽出液には、色素とペクチン様物質も含まれるが陰イオン交換樹脂カラムにより容易に除去でき、無色透明とすることができる。また、ペクチン様物質はカラムにアルカリ溶液を通すことにより回収できる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、これらに限定されるものではない。

〔実施例〕

実施例1.

市販イヌリンを熱水中に溶解し10% (W/V) とし、pH5.5に調整後、本発明のキトサンビーズ(商品名、キトパールBCW3507、富士

して固定化したDFAI合成酵素充填カラムにSV4の流速で、かつ50℃の温度をかけて連続的に反応を行った。

反応液を実施例1と同様にして分析したところDFAI: 88.9%、フラクトオリゴ糖: 12.0%、その他: 1.5%であった。

実施例4

キクイモ500gに水250mlを加え、ホームミキサーで磨砕した後、ガーゼで濾過し、濾液を得た。これを遠心分離し、その上澄に20gのセライトを加え濾過した後、得られた濾液に15gの活性炭を加え70℃で脱色、濾過を行い濾液を得た。この濾液310mlはpH5.9糖濃度7.9%であった。

この部分精製を行った原液を本発明のキトサンビーズ固定化DFAIII合成酵素を充填したカラムに昇流式で、1時間当たりビーズ量の5倍の流速で、かつ60℃の温度をかけて通液し、連続的に反応を行った。このようにして得られた反応液をイオン交換樹脂、IR120B、IRA93、MB3

特開平1-285195(4)

をそれぞれ充填したカラムに順時通液し、脱塩、脱色操作を行った。これを蒸留して水分25%のDFAIII含有シロップ28.1gを得た。

液体クロマトグラフィーにより組成を求めたところDFAIII:46.2%、フラクトオリゴ糖:46.1%、シュクロース:6.2%、グルコース:0.8%、フラクトース:0.7%であった。

実施例5

キクイモ500gを実施例3と同様の部分精製を行い原料液を得た。

これを本発明のキットサンビーズ固定化DFAI合成酵素充填カラムに昇液式で、SV4の流速で、かつ55℃の温度をかけて通液し、連続的に反応を行った。このようにして得られた反応液を実施例3と同様にし、脱塩、脱色操作を行った。これを蒸留して水分25%のDFAI含有シロップ25.3gを得た。

液体クロマトグラフィーで求めた組成は、DFAI:46.1%、フラクトオリゴ糖:46.0%、シュクロース:6.3%、フラクトース:0.8%、グルコー

ス:0.8%であった

(発明の効果)

DFA合成酵素を固定化することで酵素の繰り返し利用ができ、経済性が著しく高まるとともに、pH、塩に対する安定性が増すことにより広範囲の条件で反応が行えるようになった。また反応至適温度が5℃程度上昇し、より高温で反応がおこなえるようになったことは微生物汚染防止効果もあり、サニタリーの面でも向上したといえる。

固定化酵素カラムにより得られた反応液は通常の脱塩、脱色工程、例えば陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂等のカラムに通液することで連続的に精製することができる。

したがって、固定化DFA合成酵素を用いた反応工程と、その後の精製工程とを連続的に、時間的損失なくして運転することができる。

本発明の方法によれば、イヌリン含有植物抽出液からDFAI及び/またはDFAIIIにオリゴ糖や、単糖類を含んだ製品が得られるが、さらにDFAI及び/またはDFAIIIの純度を高めるには、

固定化酵素反応工程と、市販のゲル透過剤やイオン交換樹脂、活性炭等のカラムクロマトグラフィー、または種々の膜を用いた膜分離装置などと組み合わせることも考えられる。カラムクロマトグラフィー、または膜分離等で得られたフラクトオリゴ糖等は、副産物として既存の利用を行うこともできる。

特許出願人 日本水産省食品総合研究所長

日本製粉工業株式会社

代理人 弁護士 久保田 昌郎

